# PathoDx Chlamydia Culture Confirmation Kit

REF R62210

**FR**

## 1. DOMAINE D'APPLICATION

PathoDx™ Chlamydia Culture Confirmation est un test d'immunofluorescence conçu pour la détection et l'identification du genre *Chlamydia* après prolifération dans une culture de tissus.

## 2. RESUME ET EXPLICATION DU TEST

Les chlamydiae sont les agents étiologiques les plus courants dans les maladies sexuellement transmissibles.[15] Les chlamydiae sont des organismes intracellulaires obligatoires non mobiles, dont les parois cellulaires sont similaires à celles des bactéries à Gram négatif.[12,13] Le genre *Chlamydia* se divise en trois espèces : *C. trachomatis*, *C. psittaci* et *C. pneumoniae*, qui ont tous en commun un antigène de type lipopolysaccharide (LPS).[18]

*C. trachomatis* provoque des infections graves et souvent asymptomatiques chez l'homme.[7] Chez la femme, il est souvent responsable de la cervicite ou de la maladie inflammatoire pelvienne (MIP),[3,4,16] chez l'homme, de l'urétrite non gonococcique et de l'épididymite,[2,8,12] ainsi que de la conjonctivite à inclusions et de la pneumonie chez le nouveau-né.[1,5] *C. psittaci* est essentiellement un agent pathogène animal mais il peut provoquer des infections chez l'homme, généralement suite à une exposition à des espèces aviaires infectées. *C. pneumoniae* est une espèce récemment décrite comme responsable d'infections respiratoires aiguës, notamment la pneumonie.

Les chlamydiae se propagent en cultures de tissus grâce à un traitement chimique des cultures cellulaires visant à optimiser la sensibilité des cellules hôtes pour l'infection.[14] Actuellement, plusieurs méthodes diagnostiques sont disponibles pour détecter *C. trachomatis* dans des échantillons cliniques. Les tests immunoenzymatiques et par immunofluorescence permettent de détecter les antigènes de chlamydiae directement dans les échantillons cliniques. Les cultures cellulaires infectées par les chlamydiae peuvent être colorées avec des anticorps conjugués à l'iode, au colorant Giemsa ou à la fluorescéine.[12-14]

Les chlamydiae existent sous deux formes : un type de cellule infectieuse, appelée corps élémentaire et un type de cellule reproductive, appelé corps réticulé. Le cycle de croissance des chlamydiae commence par l'attachement et l'entrée des corps élémentaires dans le cytoplasme des cellules hôtes. Les corps élémentaires subissent alors des modifications morphologiques et forment des corps réticulés non infectieux, qui se divisent par fission binaire, ce qui constitue les inclusions.[6,14] Les corps réticulés continuent à se condenser et à se réorganiser, pour se transformer finalement en corps élémentaires, libérés par lyse cellulaire.[10,12,13]

## 3. PRINCIPE DE LA METHODE

Le kit PathoDx Chlamydia Culture Confirmation utilise des anticorps murins monoclonaux conjugués à la fluorescéine pour colorer les inclusions et/ou les corps élémentaires dans des monocouches cellulaires 48 heures après l'inoculation d'un échantillon clinique. Les anticorps monoclonaux marqués à la fluorescéine reconnaissent les deux protéines majeures de membrane externe (MOMP) de tous les sérovars de *C. trachomatis* et les lipopolysaccharides (LPS) de *Chlamydia* spécifiques au genre.

Lorsque le conjugué d'anticorps est ajouté à une lamelle de protection contenant des cellules de culture tissulaire fixées à l'éthanol, le réactif se lie de manière spécifique aux inclusions de chlamydiae présentes dans les cellules. Une étape de lavage permet d'éliminer le conjugué d'anticorps non lié. Lorsque la lamelle de protection colorée est examinée au microscope à fluorescence, de grosses inclusions brillantes, de couleur vert pomme, sont observées dans les cellules infectées sur un fond de cellules contre-colorées en rouge.

## 4. REACTIFS

CONTENU DU KIT

| Chlamydia Culture Confirmation Kit | | 100 tests (R62210) |
|---|---|---|
| 1. | Réactif de confirmation de la chlamydia | 1 flacon compte-gouttes (bouchon turquoise) |
| 2. | Fluide de montage (R62230) | 1 flacon compte-gouttes (bouchon noir) |
| 3. | Mode d'emploi | 1 |

DESCRIPTION, PREPARATION POUR UTILISATION ET CONDITIONS DE CONSERVATION RECOMMANDEES

Se référer également au paragraphe **Précautions et restrictions d'emploi**.

Conserver entre 2 et 8°C. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur l'emballage. Amener le réactif à température ambiante (entre 15 et 28°C) avant utilisation et bien mélanger en retournant *doucement* le flacon. Les anticorps monoclonaux sont prêts à l'emploi. Aucune dilution supplémentaire n'est nécessaire.

CONFIRMATION **Réactif de confirmation de la chlamydia**

Un flacon compte-gouttes en plastique contenant 5,5 ml d'anticorps monoclonaux murins purifiés marqués à la fluorescéine, du contre-colorant bleu d'Evans, un inhibiteur de coloration non spécifique, et 0,098% d'azide de sodium dans une solution tampon stabilisée avec des protéines.

MOUNTING FLUID **Fluide de montage**

Un flacon compte-gouttes en plastique contenant 5,0 ml de liquide de montage, composé de glycérol tamponné, avec 0,01% d'azide de sodium comme conservateur.

## 5. PRECAUTIONS ET RESTRICTIONS D'EMPLOI

IVD

Les réactifs sont destinés exclusivement au diagnostic *in vitro*.

Réservé à un usage professionnel.

Pour obtenir des informations sur les composants potentiellement dangereux, se référer à la fiche de sécurité fournie par le fabricant et à l'étiquetage du produit.

INFORMATIONS DE SECURITE

1. L'azide de sodium (moins de 0,1%) a été ajouté aux réactifs comme agent antibactérien. Pour prévenir l'accumulation d'azides métalliques explosifs dans les canalisations en plomb et en cuivre, les réactifs ne doivent être déversés dans le système d'égouts que s'ils sont dilués et mélangés à de grands volumes d'eau. Il est préférable d'utiliser des canalisations sans cuivre et sans plomb.
2. **Échantillons cliniques :** Les précautions de sécurité adaptées doivent être respectées lors de la manipulation et du traitement des échantillons cliniques car ils peuvent contenir des organismes vivants pathogènes. Les bonnes pratiques de laboratoire doivent être suivies lors de la manipulation des cultures pouvant contenir des virus infectieux.
3. **Déchets :** Stériliser tous les déchets avant de les jeter, en suivant les procédures propres au laboratoire et les réglementations locales.
4. Présence du colorant bleu Evans dans le réactif. Bien que le produit soit en concentrations inférieures à celles qui requièrent qu'on le classe comme cancérogène, éviter tout contact avec la peau.

PRECAUTIONS D'ANALYSE

Ce produit ne doit pas être utilisé si (1) la couleur du réactif a changé, (2) la date de péremption est dépassée ou (3) s'il présente d'autres signes de détérioration.

## 6. PRELEVEMENT, CONSERVATION ET TRANSPORT DES ECHANTILLONS

**Prélèvement et culture des échantillons**

Prélever les échantillons du patient de manière appropriée selon le site anatomique infecté, les placer dans un milieu de transport adapté et les envoyer au laboratoire pour analyse. Le milieu de transport ne doit pas inhiber la croissance de *Chlamydia* spp. ou des cellules en culture. Inoculer une monocouche de cellules McCoy ou HeLa 229 avec l'échantillon du patient, selon une méthode approuvée.[6,9,11,14] La coloration peut être effectuée 48 heures après l'inoculation.

En complément de chaque lot d'échantillons de patients, il est recommandé de traiter les cellules infectées par la *Chlamydia* et les cellules en culture non infectées comme contrôles positif et négatif.

Les échantillons peuvent être conservés entre 2 et 8°C pendant 24 heures maximum après le prélèvement, sans perte conséquente du pouvoir infectieux. Pour de meilleurs résultats, il est recommandé de traiter les échantillons immédiatement. Une conservation de plus de 24 heures requiert une température ne dépassant pas -70°C. Au cours du transport, conserver l'échantillon à la même température que celle utilisée pour la conservation.

## 7. PROCEDURE

MATERIEL FOURNI

Le kit Chlamydia Culture Confirmation (R62210) permet la réalisation de 100 tests (voir **Contenu du kit**).

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

1. Microscope à fluorescence avec le système de filtre adapté à l'isothiocyanate de fluorescéine (longueur d'onde d'excitation maximum = 490 nm ; émission maximum = 520 nm ; objectifs grossissants de 100X et de 400 à 500X)
2. Eau déminéralisée ou PBS à 0,05 M
3. Gros écouvillons en coton ou en polyester (pour nettoyer l'exocol)
4. Écouvillons de prélèvement stériles (qui n'inhibent pas la prolifération de *Chlamydia* spp.)
5. Milieu de transport pour Chlamydia
6. Milieu d'isolement de Chlamydia contenant du cycloheximide
7. Tubes shell vial (verre ; 1,77 gramme)
8. Cellules McCoy ou HeLa 229 - pour les échantillons de patients, et comme contrôles positif et négatif (recommandé)
9. Centrifugeuse
10. Éthanol à 95% (qualité réactif)
11. Pince
12. Lames de microscope
13. Lamelles de protection (12 mm de diamètre)
14. Papier buvard pour les lames
15. Bécher ou jarre de Coplin (pour rincer les lamelles de protection)
16. Incubateur (37°C)
17. Chambre humide

PROCEDURE DU TEST

| | |
|---|---|
| **Fixation** | |
| **Etape 1** | Enlever le milieu des flacons inoculés et ajouter immédiatement de l'éthanol à 95% en quantité suffisante pour recouvrir complètement la monocouche. Laisser reposer pendant 1 à 10 minutes. |
| **Etape 2** | Aspirer l'éthanol et retirer les lamelles de protection à l'aide de la pince. Poser la tranche de la lamelle de protection sur du papier buvard pour enlever l'excès d'éthanol. |
| **Etape 3** | Placer la lamelle de protection, cellules vers le haut, sur une lame de microscope propre et étiquetée. Les lamelles de protection doivent être colorées dans les 24 heures. Si la coloration ne peut être effectuée dans ce délai, conserver la lamelle de protection dans un tube shell vial avec de l'éthanol à -70°C. |
| **Coloration** | |
| | Les monocouches cellulaires doivent demeurer humides à toutes les étapes de la procédure. Le réactif de confirmation de la chlamydia doit être stocké à température ambiante (15-28°C) avant utilisation. Bien mélanger le réactif de confirmation de la chlamydia avant utilisation, en retournant *doucement* le flacon. |
| **Etape 1** | Ajouter **une goutte** de réactif de confirmation de la chlamydia sur les cellules fixées. **Ne pas ajouter de réactif sur une monocouche complètement sèche;** toujours réhumidifier les cellules avec du PBS ou de l'eau déminéralisée avant d'ajouter le réactif pour garantir que la monocouche sera complètement recouverte. |
| **Etape 2** | Placer les lames dans une chambre humide et laisser incuber pendant **30 minutes à 37°C**. Ne pas laisser l'anticorps sécher sur la lamelle de protection, sous peine d'obtenir une coloration non spécifique. |

**Etape 3** À l'aide de la pince, bien rincer les lamelles de protection en les agitant pendant 10 à 15 secondes dans un bécher ou une jarre de Coplin rempli d'eau déminéralisée ou de PBS. Poser la tranche de la lamelle de protection sur du papier buvard pour enlever l'excès d'humidité.

**Etape 4** Ajouter **une goutte** de fluide de montage sur une lame de microscope propre. Retourner la lamelle de protection et la placer, cellules vers le bas, sur le liquide de montage. Enlever les bulles d'air.

**Etape 5** Examiner les lames immédiatement après coloration à l'aide d'un microscope à fluorescence. Examiner les monocouches au grossissement de 100X, et confirmer la morphologie au grossissement de 400X à 500X. S'il est nécessaire de retarder la lecture, conserver les lames après montage entre 2 et 8°C et à l'obscurité. Pour des meilleurs résultats, les lames doivent être lues dans les 24 heures. Noter que sur les lames portant un conjugué marqué à la fluorescéine, la couleur s'affaiblit lorsqu'elles sont exposées à la lumière. Laisser les lames atteindre la température ambiante avant lecture.

**Procédure de coloration optionnelle des lamelles de protection dans les tubes shell vial**

**Etape 1** Suivre l'étape 1 de la procédure de fixation comme indiqué ci-dessus. Aspirer l'éthanol après 10 minutes.

**Etape 2** Ajouter du réactif de confirmation de la chlamydia (environ 3-4 gouttes) en quantité suffisante pour couvrir la lamelle de protection. Reboucher le tube shell vial et incuber pendant 30 minutes à 37°C.

**Etape 3** Laver la lamelle de protection deux fois à l'eau déminéralisée ou distillée ou dans du PBS 0,05 M.

**Etape 4** Ajouter une goutte de liquide de montage sur une lame de microscope propre. À l'aide de la pince, enlever la lamelle de protection du tube shell vial. Poser la tranche de la lamelle de protection sur du papier buvard pour enlever l'excès d'humidité et la placer, cellules vers le bas, sur le liquide de montage.

**Etape 5** Suivre l'étape 5 de la **procédure de coloration** comme indiqué ci-dessus.

## 8. CONTROLE QUALITE

En complément de chaque lot d'échantillons de patients, il est recommandé de traiter les cellules infectées par la *Chlamydia* et les cellules en culture non infectées comme contrôles positif et négatif respectivement, afin de vérifier les performances du microscope, du système de culture et des réactifs. Les résultats du test sont acceptables uniquement si les cellules de culture infectées par la *Chlamydia* contiennent elles aussi des inclusions apparaissant en fluorescence vert brillant par rapport à une monocouche contre-colorée en rouge foncé, et si les cellules non infectées ne présentent pas d'inclusions vert brillant.

## 9. INTERPRETATION

**Résultats positifs**

Les cultures fixées et colorées qui sont positives aux chlamydiae contiennent des inclusions qui apparaissent en fluorescence vert pomme, contre des cellules en monocouche contre-colorées en rouge foncé. La taille des inclusions varie en fonction des conditions de culture et du sérovar. La présence d'une inclusion suffit à donner un résultat *positif*.

Des exemples d'inclusions de chlamydiae colorées à la fluorescéine peuvent être consultés dans les publications scientifiques.[17] Cependant, selon les anticorps monoclonaux marqués à la fluorescéine, le motif de fluorescence peut varier.

**Résultats négatifs**

Les cultures fixées sont considérées comme *négatives* lorsqu'aucune inclusion vert brillant n'est détectée dans la monocouche de cellules contre-colorées en rouge foncé.

## 10. LIMITES

1. La détection des Chlamydiae dans les échantillons mis en culture dépend de la qualité du prélèvement des échantillons, du transport, de la technique de culture des tissus et de a préparation des lames.
2. Le kit PathoDx Chlamydia Culture Confirmation a été testé uniquement pour une utilisation lors de la détection et de l'identification de *Chlamydia* dans des cultures de tissus.
3. Aucune donnée n'est disponible concernant les performances du kit PathoDx Chlamydia sur des échantillons de patients recueillis pendant ou après un traitement antibiotique.
4. Les monocouches cellulaires doivent demeurer humides à toutes les étapes de la procédure de confirmation par culture.
5. Le réactif de travail (Réactif de confirmation de la chlamydia) est prêt à l'emploi et est optimisé pour détecter les espèces connues de *Chlamydia*. Une dilution ou toute autre altération du réactif de travail peut provoquer une perte de sensibilité.
6. Ce test ne permet pas de différencier les espèces de *Chlamydia* ou les sérovars de *Chlamydia trachomatis*.

## 11. CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

**Essais cliniques**

Les évaluations cliniques ont été menées dans deux laboratoires indépendants pour comparer les performances du kit PathoDx Chlamydia Culture Confirmation à celles du C. trachomatis Culture Confirmation Test MicroTrak®. Chaque site d'investigation a analysé des échantillons cliniques n'ayant pas été diagnostiqués auparavant, mis en culture cellulaire monocouche McCoy à 35°C. Les monocouches ont ensuite été fixées, colorées et examinées conformément aux procédures indiquées dans les notices PathoDx et MicroTrak® correspondantes.

Au total, 250 échantillons cliniques ont été analysés. Sur le site numéro un, 87 échantillons prélevés au niveau du col de l'utérus et 13 échantillons prélevés au niveau de l'urètre ont été recueillis sur un écouvillon, chez 100 adolescents ayant une vie sexuelle active, âgés de 12 à 20 ans. Parmi ces 100 adolescents, la prévalence d'infection aux chlamydiae était de 24%. Sur le site numéro deux, 98 et 52 échantillons ont été prélevés chez des adultes, respectivement au niveau du col de l'utérus et de l'urètre. Parmi ces 150 adultes, la prévalence de l'infection aux chlamydiae était de 39%. Les résultats combinés des deux sites apparaissent ci-dessous.

Dans l'ensemble, le test PathoDx était sensible à 100% et spécifique à 100%.

| | | MicroTrak® | |
|---|---|---|---|
| | | Pos. | Nég. |
| PathoDx | Pos. | 82 | 0 |
| | Nég. | 0 | 168 |

**Spécificité**

Pour établir la réactivité **spécifique du genre** du réactif de confirmation de la chlamydia PathoDx, des espèces connues du genre *Chlamydia*, notamment *C. psittaci* et les 15 sérovars connus de *C. trachomatis* ont été testés. Toutes les espèces de *Chlamydia* ont présenté une coloration à la fluorescéine.

Afin de vérifier la spécificité du kit PathoDx Chlamydia Culture Confirmation, des organismes bactériens, fongiques et viraux ont été testés pour déterminer la réactivité croisée (voir tableau ci-dessous). Les micro-organismes ont été mis en culture dans un bouillon et 10 µl d'une suspension contenant $1 \times 10^9$ unités formant colonie par millilitre, ou sur des monocouches cellulaires infectées par un virus avec une multiplicité d'infection MOI inférieure à 0,01 ; ils ont ensuite été fixés sur une lame conformément à la procédure indiquée dans le présent document. Aucun des organismes testés n'a montré de réactivité croisée.

| Micro-organisme | Souche |
|---|---|
| *Acinetobacter baumannii* | ATCC® 17904 |
| *Candida albicans* | 166 Nelson/CA |
| *Candida tropicalis* | PN 1164 |
| Cytomégalovirus | AD169 |
| *Enterococcus faecalis* | PN 1120 |
| *Escherichia coli* | ATCC® 29194 |
| *Haemophilus influenzae* Type A | AANEN 1217 |
| Virus Herpes Simplex, type I | MacIntyre |
| Virus Herpes Simplex, type II | MS |
| *Klebsiella pneumoniae* | 33495 |
| *Lactobacillus acidophilus* | PN 1126 |
| *Lactobacillus casei* | PN 1078 |
| *Moraxella osloensis* | PN 1339 |
| *Mycoplasma genitalium* | ATCC® 33530 |
| *Mycoplasma hominis* | ATCC® 23114 |
| *Neisseria gonorrhoeae* | PN 1138 |
| *Neisseria gonorrhoeae* | PN 1177 |
| *Neisseria gonorrhoeae* | PN 1282 |
| *Neisseria meningitidis* Groupe A | ATCC® 13077 |
| *Neisseria meningitidis* Groupe B | ATCC® 13090 |
| *Neisseria meningitidis* Groupe C | ATCC® 13102 |
| *Neisseria meningitidis* Groupe D | ATCC® 13113 |
| *Neisseria sicca* | PN 1101 |
| *Proteus mirabilis* | ATCC® 25933 |
| *Proteus vulgaris* | PN 1062 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | PN 1280 |
| *Salmonella minnesota* | R 595 |
| *Salmonella typhi* | ATCC® 6539 |
| *Salmonella typhimurium* | ATCC® 14028 |
| *Staphylococcus aureus* Cowan I | ATCC® 12598 |
| *Staphylococcus epidermidis* | PN 5204 |
| *Streptococcus agalactiae* | 090R |
| *Streptococcus pyogenes* | ATCC® 10389 |

## 12. BIBLIOGRAPHIE


1. Beem, M.O. and E.M. Saxon. 1977. N. Engl. J. Med. 296:306-310.
2. Bowie, W.R., W. San-Pin, E.R. Alexander, J. Floyd, P.S. Forsyth, H.M. Pollock, J.L. Lin, T. M. Buchanan, and K.K. Holmes. 1977. J. Clin. Invest. 59:735-742.
3. Brunham, R.C., I.W. Maclean, B. Binns, and R.W. Peeling. 1985. J. Infect. Dis. 152:1275-1282.
4. Curran, J.W. 1980. Amer. J. Obstet. Gynecol. 138:848-851.
5. Hammerschlag, M.R., M. Anderda, D.Z. Semine, D. McComb, and W.M. McCormack. 1979. Pediatrics. 64:142-148.
6. Kuo, C., S.P. Wand, B.B. Wentworth, and J.T. Grayston. 1972. J. Infect. Dis. 125:665-668.
7. Krieg, N.R. and J.G. Holt. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
8. Paavonen J., et al. 1978. J. Clin. Invest. 59:735-742.
9. Ripa, K.T. and P. Mardh. 1977. J. Clin. Microbiol. 6:328-331.
10. Sabet, S.F., J. Simmons, and H.D. Caldwell. 1984. J. Clin. Microbiol. 20:217-222.
11. Sawicki, L. 1980. Lab. Man. 18(11):42-47.
12. Schachter, J. 1978. N. Engl. J. Med. 298:428-435, 490-495, 540-549.
13. Schachter, J. and H.D. Caldwell. 1980. Ann. Rev. Microbiol. 34:285-309.
14. Sierra, M.F., et al. 1988. Lab. Med. 19:311-314.
15. Thompson, S.E. and A.E. Washington. 1983. Epidemiologic Rev. 5:96-123.
16. Westrom, L. 1980. Amer. J. Obstet. Gynecol. 138:880-892.
17. Laboratory Update: Isolation of Chlamydia trachomatis in Cell Culture. 1980. U.S. Dept. H.H.S., CDC # 80-109.
18. Rothermel, C.P., et al. 1989. Abstracts of the 89th Annual Meeting of the American Society for Microbiology. ASM, Washington, D.C.


## 13. CONDITIONNEMENT

REF R62210..... 100 tests/kit

**Légende des symboles**

| | |
|---|---|
| REF | Numéro de référence |
| IVD | Dispositif médical de diagnostic in vitro |
| LAB | Utilisation en laboratoire |
| | Consulter le mode d'emploi |
| | Limite de température |
| LOT | Code de lot |
| | A utiliser avant le |
| | Fabricant |


PathoDx est une marque de commerce déposée de Remel Inc. ATCC® est une marque de commerce déposée d'American Type Culture Collection.

MicroTrak® est une marque de commerce déposée de PLC de Biotech de trinité.



IFU X7784 révisé Novembre 2012



Remel Europe Ltd.
Clipper Boulevard West, Crossways
Dartford, Kent, DA2 6PT
UK


Pour obtenir une assistance technique, contacter le distributeur local.